

**KATEDRA I ZAKŁAD PATOMORFOLOGII
KLINICZNEJ
UNIwersytetu Medycznego w Lublinie**

Kierownik Prof. dr hab. n. med. Justyna Szumiło
20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8b, tel. (81) 448 65 30; 448 65 32 fax (81) 448 65 31
e-mail: patomorfologia@umlub.pl www.patomorfologia.lublin.pl

Ocena
rozprawy doktorskiej lekarz Moniki Durzyńskiej
pt. „Ocena udziału wirusa brodawczaka ludzkiego
***o wysokim ryzyku onkogennym w rozwoju raka gardła środkowego*”**
wykonanej w Centrum Onkologii-Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie
pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Moniki Prochorec-Sobieszek;
promotor pomocniczy dr n. med. Anna Szumera-Ciećkiewicz

Zmiany w epidemiologii nowotworów w zależności od zmieniających się czynników ryzyka są dobrze znane w medycynie, a klasycznymi tego przykładami mogą być gruczolakoraki dystalnej części przełyku lub płuca, których częstość występowania dramatycznie wzrosła w krajach Europy Zachodniej i USA w ostatnich kilkudziesięciu latach. Do tej grupy możemy także zaliczyć raka płaskonabłonkowego ustnej części gardła, który przez lata był uznawany, za typowy nowotwór tytoniozależny, ale ostatnio wykazano wzrost częstość występowania jego podtypu związanego z zakażeniem wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV). O odrębności raka płaskonabłonkowego gardła związanego z HPV może świadczyć fakt jego wyróżnienia zarówno w najnowszej klasyfikacji WHO Nowotworów Głowy i Szyi (2017), jak i w 8. edycji klasyfikacji TNM (2017). Rozpoznanie patomorfologiczne tego nowotworu wymaga potwierdzania zakażenia HPV w wycinku z guza, co jest możliwe w oparciu o kilka metod o różnej dostępności w ośrodkach zajmujących się rutynową diagnostyką. W nurt badań nad tą stosunkowo niedawno wyróżnioną grupą nowotworów wpisują się dociekania naukowe lekarz Moniki Durzyńskiej.

Przedstawiona do recenzji rozprawa liczy 135 stron wydruku komputerowego i ma typowy układ.

We wstępie liczącym 26 stron Autorka przedstawia zagadnienia związane z epidemiologią raka płaskonabłonkowego ustnej części gardła w zależności od statusu HPV, z uwzględnieniem czynników ryzyka oraz związku lokalizacji nowotworu z budową histologiczną tej części gardła. Następnie niezwykle szczegółowo i wyczerpująco omawia proces karcynogenezy w ustnej części gardła, przybliżając budowę wirusa HPV, przebieg

zakażenia i procesu transformacji oraz związek genotypu z rodzajem zmian morfologicznych. Kolejna część wstępu poświęcona jest metodom oceny statusu HPV, analizie wytycznych oceny tego statusu opracowanych przez różne organizacje i towarzystwa naukowe oraz opisowi obrazu mikroskopowego raka płaskonabłonkowego zależnego od HPV. Znaczna część wstępu dotyczy aktualnie obowiązującej klasyfikacji WHO Nowotworów Głowy i Szyj oraz nowej klasyfikacji TNM nowotworów ustnej części gardła uwzględniającej podział na raki w zależności od statusu HPV, a także znaczeniu klinicznemu oceny statusu w nowotworach w tej lokalizacji. Rozdział uzupełniają bardzo plastyczne trzy ryciny oraz dziewięć tabel, w których zestawiono najważniejsze informacje omawiane we wstępie.

Wstęp poprzedza spis skrótów zastosowanych w rozprawie wraz z wyjaśnieniami.

Następnie pani Durzyńska formułuje cztery podstawowe cele rozprawy, którymi są: ocena częstości występowania infekcji HPV w raku płaskonabłonkowym ustnej części gardła w zależności od zastosowanej metody badawczej i porównanie metod, analiza danych kliniczno-histologicznych u chorych na ten nowotwór w zależności od statusu HPV oraz optymalizacja schematu diagnostycznego z uwzględnieniem oceny statusu HPV.

W rozdziale zatytułowanym „Materiały i metoda” Doktorantka opisuje zasady doboru pacjentów do grupy badanej. Były to osoby z rakiem ustnej części gardła, diagnozowane w Zakładzie Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej oraz leczone w Klinice Nowotworów Głowy i Szyi Centrum Onkologii-Instytut (COI) w Warszawie w ciągu jedenastu lat (2007-17). Informacje dotyczące wieku, płci, umiejscowienia guza w obrębie ustnej części gardła, stopnia zaawansowania klinicznego wg kryteriów 7. edycji klasyfikacji TNM i palenia tytoniu uzyskała z systemu informatycznego Centrum. Dodatkowo po ocenie statusu HPV reklasyfikowała stopień zaawansowania wg kryteriów 8. edycji. Oceniała archiwalne preparaty histologiczne, służące do diagnostyki pierwotnej lub konsultowane w COI pod kątem jakości materiału tkankowego i odsetka utkania nowotworowego. Natomiast materiał prospektywny z guzów ustnej części gardła utrwalano i przeprowadzano w sposób rutynowy do bloczków parafinowych oraz krojono skrawki do badań immunohistochemicznych i rutynowego barwienia HE. Następnie pani Durzyńska dokonała weryfikacji rozpoznań histopatologicznych z oceną podtypu morfologicznego raka płaskonabłonkowego wg kryteriów Lewisa, wyodrębniając trzy podstawowe warianty morfologiczne – rak rogowaciejący, nierogowaciejący i nierogowaciejący z dojrzwianiem, a także inne podtypy raka wg kryteriów klasyfikacji WHO Nowotworów Głowy i Szyi (rak bazaloidny, brodawkowaty, limfatyczno-nabłonkowy i gruczołowo-płaskonabłonkowy).

Poza podtypem histologicznym, określała stopień złośliwości histologicznej (G) w skali trójstopniowej i obecność zmian wewnątrz nabłonkowych, o ile było to możliwe.

Następnie dokonała oceny statusu HPV w badanym materiale trzema metodami. Przeprowadziła odczyn immuohistochemiczny na białko p16 stosując przeciwciało monoklonalne CINtec p16 Histology (klon E6H4) (Roche Diagnostics) z *ultraView* Universal DAB Detection Kit przy użyciu zautomatyzowanego systemu Ventana BenchMark ULTRA wg protokołu producenta. Za dodatni wynik odczynu uznawała jednocześnie spełnienie czterech kryteriów: rozlana, cytoplazmatyczno-jądrowa, intensywna reakcja barwna w $\geq 70\%$ komórek raka. Jeżeli odczyn nie wykazywał wszystkich wymienionych cech był traktowany jako ujemny. Uwzględniała tzw. odczyny ujemne graniczne (słaby lub średnio-intensywny, cytoplazmatyczny i/lub jądrowy, rozlany lub brzeżny odczyn w 70-100% komórek raka lub intensywny, cytoplazmatyczno-jądrowy, rozlany lub brzeżny, odczyn w 50-69% komórek raka). Doktorantka przeprowadzała także badanie DNA HPV metodą hybrydyzacji *in situ* (ISH) stosując zestaw Inform HPV III Family 16 probe (Ventana Medical Systems), będący koktajlem znakowanych sond wykrywających dwanaście genotypów HPV o wysokim ryzyku onkogennym, przy użyciu systemu Ventana BenchMark ULTRA wg protokołu producenta. Zastosowała zestaw detekcyjny ISH iVIEW Blue Plus Detection Kit. Wynik badania ISH oceniała jako dodatni, jeżeli wykryła w mikroskopie świetlnym przynajmniej w jednym jądrze komórkowym raka typ wybarwienia charakterystyczny dla formy episomalnej (pojedyncza, duża, homogenna niebieska kropka w jądrze) i/lub zintegrowanej wirusa (liczne, małe, niebieskie kropki w jądrach). Natomiast ocenę DNA HPV metodą PCR prowadziła przy użyciu zautomatyzowanego systemu Roche Cobas 4800, który pozwala na wykrycie czternastu genotypów HPV w materiale z blozków parafinowych przeprowadzonym do podłoża płynnego. Cała procedura została wykonana zgodnie z protokołem badania zalecanym przez producenta. Materiał z guza był automatycznie kwalifikowany jako: negatywny, bez walidacji, dodatni na obecność HPV16, HPV18 lub inny genotyp. Dodatkowo w sporadycznych przypadkach, w których wykryła genotypy inne niż HPV16 i 18, we współpracy z Zakładem Patologii, Oddział COI w Gliwicach, stosowała multipleksową reakcję PCR z genotypowaniem. Rozdział kończy krótki opis analizy statystycznej, do której zastosowała adekwatne testy.

Najważniejszą częścią dysertacji są wyniki, których opis został wzbogacony o jedenaście rycin i osiem tabel. W badanej grupie przeważali mężczyźni (ok. 79%); średnia wieku dla grupy wynosiła 60,17 lat, a szczyt zachorowań – 56-61 lat. Blisko 58% pacjentów paliło papierosy w momencie rozpoznania choroby. Większą część badanego

materiału stanowiły wycinki biopsyjne (blisko 92%), diagnozowane pierwotnie w COI (ok. 79%) i pobrane ze zmiany zlokalizowanej w migdałku podniebiennym (ok. 79%). Nowotwory w stopniu T2, T3 i T4 występowały ze zbliżoną częstością – odpowiednio ok. 29,86, 28,47 i 27,78%. Podobna była też częstość przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych ocenianych, jako N0, N1 i N3 – odpowiednio ok. 15,28, 12,50 i 15,28%. Wg kryteriów 7. edycji TNM 78,47% pacjentów zostało zaliczonych do grupy prognostycznej o najgorszym rokowaniu. Najczęstsze były warianty nierogowaciejący (39,87%) i rogowaciejący (38,51%) raka płaskonabłonkowego części ustnej gardła. Dodatni wynik odczynu immunohistochemicznego na białko p16 stwierdzono w 56,08% przypadków, przy czym w ponad 95% reakcja barwna występowała w więcej niż 90% komórek nowotworowych. Obecność wirusowego DNA wykazano metodą ISH w 47,97% raków, z niską liczbą kopii genu w 76,06% przypadkach oraz przeważającą formą zintegrowaną (ok. 31%). Natomiast obecność DNA HPV metodą PCR wykryto w 58,45% nowotworów, z dominującym genotypem HPV16 (96,38%). U 3 pacjentów wykryto inne genotypy HPV o wysokim ryzyku (HPV 33 i 59). Analizując wyniki statusu HPV z równoczesnym zastosowaniem trzech metod Autorka uzyskała potrójnie zgodne wyniki u 85,92% pacjentów (zgodne dodatnie u 47,18%, zgodne ujemne u 38,73% osób) i wykazała istotny statystycznie związek ($p < 0.000001$) między oceną statusu HPV określoną immunohistochemicznie (p16) a technikami ISH i PCR, przy czym czułość i swoistość metody ISH względem PCR wynosiła odpowiednio 85,36% i 100%. W badanej grupie pacjenci z rakiem zależnym od HPV byli wyodrębniani na podstawie równoczesnego dodatniego wyniku odczynu immunohistochemicznego (IHC p16) i DNA HPV, niezależnie od metody (ISH i/lub PCR). Doktorantka przeanalizowała trzy algorytmy diagnostyczne, zilustrowane na rycinach. W każdym najpierw wykonywano odczyn immunohistochemiczny a następnie oceniano DNA HPV przy pomocy PCR (algorytm 1), ISH (algorytm 2) lub ISH, a w przypadkach ujemnych także PCR (algorytm 3). Po zastosowaniu algorytmów 1 i 3 uzyskała identyczny, wysoki odsetek równoczesnych wyników dodatnich (IHC p16+/DNA HPV+) – 53,38%, podczas gdy w algorytmie 2 odsetek ten był niższy (45,27%). Porównując parametry kliniczno-morfologiczne u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym HPV-zależnym i niezależnym Doktorantka wykazała, że w grupie z rakiem HPV+ stosunek liczby mężczyzn do kobiet był istotnie niższy (2,67 vs. 5,9; $p = 0,031$), rzadziej występowały osoby palące (37,93 vs. 82,14%; $p < 0,001$), a nowotwór rozwijał się częściej w migdałku podniebienny i nasadzie języka (57,89 vs. 86,67%; $p < 0,001$), był mniej miejscowo zaawansowany (T1-T2 – 59,21% vs. 26,47%; $p < 0,001$) i częściej dawał przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych (93,43%

vs. 75,00%; $p=0,004$) przy zastosowaniu kryteriów 7. edycji klasyfikacji TNM. Stosując kryteria 8. edycji wykazała istotny wzrost odsetka chorych z rakiem HPV+ w grupie o pomyślnym rokowaniu (I i II – 77,63 vs. 3,93%; $p<0,001$). Ponadto, w grupie tej zamiennie częściej obserwowano wariant nierogowaciejącym (93,23 vs. 6,77%; $p<0,001$) i niski stopień zróżnicowania raka (G3) (93,67 vs. 30,43%; $p<0,001$). Dodatkowo pani Durzyńska pokusiła się o zoptymalizowanie schematu diagnostycznego raka płaskonabłonkowego ustnej części gardła z uwzględnieniem oceny statusu HPV. Schemat ten uwzględnia: określenie wariantu histopatologicznego raka, wykonanie badań dodatkowych (barwienia histo- i immunohistochemiczne) w przypadkach nietypowego obrazu mikroskopowego, ocenę statusu HPV przy pomocy metody IHC p16 i technik wykrywających DNA HPV. Autorka podaje także szczegółowo informacje, które powinien zawierać raport histopatologiczny w rakach płaskonabłonkowych ustnej części gardła.

Następną niezwykle wartościową częścią dysertacji jest Dyskusja, licząca 32 strony. Doktorantka szczegółowo konfrontuje w niej własne wyniki w doniesieniach innych autorów. Dyskusja jest strukturyzowana, co pozwoliło na jej usystematyzowanie i odniesienie się do wszystkich ważniejszych aspektów pracy, począwszy od spraw technicznych (wykonywanie i ocena IHC, ISH, PCR), poprzez porównanie i próby wyjaśnienia różnic wyników prac własnych z danymi z piśmiennictwa, do sugestii praktycznego zastosowania wyników w diagnostyce patomorfologicznej raków płaskonabłonkowych ustnej części gardła. Doktorantka zastosowała także wyróżnienia ważniejszych fragmentów tekstu oraz dodała sześć rycin i trzy tabele, zawierające przede wszystkim informacje o wynikach prac własnych w odniesieniu do danych literaturowych. Taka dodatkowa forma analizy piśmiennictwa jest bardzo pomocna dla czytelnika i pozwala lepiej śledzić tok rozumowania Autorki. Dyskusja jest spójna, napisana w sposób klarowny, z niewątpliwie dużym znawstwem poruszanej problematyki, nie tylko w odniesieniu do spraw naukowych, ale także praktycznych.

Wyniki badań zostały podsumowane w siedmiu rozbudowanych wnioskach, które odpowiadają celom postawionym przez lekarz Monikę Durzyńską. Dowiodła one, że częstość występowania raka ustnej części gardła określanego jako HPV-zależnego różni się w zależności od zastosowanej pojedynczej techniki wykrywania infekcji (IHC p16, HPV ISH lub PCR), przy czym wyższy jest odsetek przypadków wykrywanych przy użyciu metod IHC p16 i HPV PCR w porównaniu do HPV ISH. Jednoczesne zastosowanie wszystkich metod pozwala na uzyskanie wyników potrójnie zgodnych w 85,92% przypadków, a chorzy na raka HPV-zależnego ustnej części gardła powinni być definiowani na podstawie równoczesnego dodatniego wyniku badania IHC p16 i DNA HPV. Badanie IHC p16 należy uznać za metodę

„pierwszej linii” w klasyfikowaniu chorych do oceny DNA HPV lub do stosowania samodzielnego, w przypadku braku możliwości wykonania badań molekularnych. Częstość występowania raka ustnej części gardła HPV-zależnego (IHC p16+/ DNA HPV+) wynosiła 53,37%, co jest zbieżne z doniesieniami z piśmiennictwa, przy czym najczęściej wykrywanym genotypem wirusa był HPV16. Rak HPV-zależny istotnie częściej rozwijał się u pacjentów niepalących, z wariantem nierogowaciejącym raka płaskonabłonkowego i w lokalizacjach anatomicznych zawierających utkanie chłonne. Chorzy na raka HPV-zależnego statystycznie częściej wykazywali niski stopień zaawansowania guza pierwotnego i wyższy odsetek przerzutów do węzłów chłonnych. Zastosowanie kryteriów z nowej 8. edycji klasyfikacji TNM spowodowało zwiększeni odsetka chorych zaliczonych do grup o pomyślnym rokowaniu. W ostatnim wniosku Autorka wyraża opinię dotyczącą konieczności oceny statusu HPV w raku ustnej części gardła i jej uwzględnienia w raporcie patomorfologicznym, z podaniem techniki wykrywania infekcji oraz przydatności zaproponowanego algorytmu diagnostycznego.

Kolejną, bardzo ważną, zwłaszcza dla patomorfologa częścią rozprawy jest dokumentacja fotograficzna, określona przez Doktorantkę jako: Anex – fotografie. Zawiera ona jedenaście złożonych rycin po sześć zdjęć każda, z preparatów mikroskopowych prezentujących raki płaskonabłonkowe gardła (preparaty barwione hematoksyliną i eozyną, odczyny immunohistochemiczne na p16, wyniki badania DNA HPV metodą ISH) oraz przykładowych raportów badań metodą PCR. Zdjęcia są dobrej jakości, właściwie wyselekcjonowane, tak aby zobrazować wyniki prowadzonych badań.

Rozprawę kończy zestawienie tytułów tabel zamieszczonych w pracy oraz bardzo dobrze dobrany i wyczerpujący spis piśmiennictwa obejmujący 236 pozycji, niemal wyłącznie w języku angielskim, z których zaledwie 18 ukazało się przed rokiem 2010.

W skład manuskryptu wchodzą także obszerne streszczenia w języku polskim i angielskim.

W mojej opinii, przedstawiona do recenzji dysertacja jest pracą oryginalną i wartościową, o dużych walorach zarówno poznawczych, jak i praktycznych. Lekarka Monika Durzyńska wykazała się dobrą znajomością tematu i umiejętnością analitycznego myślenia. Zebrała i szczegółowo oceniła duży, zwłaszcza w polskich warunkach, materiał badawczy, zastosowała i porównała przydatność kilku metod wykrywania wirusa brodawczaka ludzkiego oraz sformułowała algorytm postępowania w rutynowej diagnostyce histopatologicznej raków płaskonabłonkowych części ustnej gardła. Dowodzi to

doświadczenia w pracy patomorfologa oraz cennej umiejętności wykorzystania tego doświadczenia w praktyce, poszerzonego o wiedzę wynikającą z zastosowania nowoczesnych metod. Praca jest napisana precyzyjnym, a jednocześnie zrozumiałym językiem, z dużą dbałością o szatę graficzną. Uwzględnia udogodnienia dla czytelnika pod postacią spisów skrótów i rycin, wyróżnień tekstu oraz przemyślanych i estetycznych rycin i tabel.

Jako recenzent mam także parę uwag, głównie technicznych dotyczących manuskryptu. Moim zdaniem wnioski wynikające z pracy są zbyt rozbudowane, zawierają też niepotrzebne odniesienia do piśmiennictwa. Na ryc. 12 (str. 53) przedstawiającej algorytm 3 niejasne jest dla mnie umiejscowienie reakcji PCR, ponieważ zgodnie z opisem w tekście powinna być ona wykonywana jedynie w przypadkach ISH-ujemnych. Na tej samej stronie wkradł się też błąd dotyczący opisu przypadków o wynikach rozbieżnych. Autorka nie podaje nazwy programu statystycznego, którego użyła do analizy. Ponadto, zgodnie z przyjętymi zasadami opisy rycin powinny znajdować się pod ryciną i kończyć kropką, natomiast tytuły tabel oraz tytuły rozdziałów/podrozdziałów powinny pozostać bez kropki. W spisie piśmiennictwa należy stosować ogólnie przyjęte skróty czasopism, bez dopisków dotyczących przynależności do towarzystw naukowych. Autorka nie ustrzegła się drobnych błędów interpunkcyjnych, niepotrzebnego powtarzania wyrazów czy niezgrabnych sformułowań. Rzadko stosuje podmiot domyślny. Na zakończenie wstępu i dyskusji brakuje kilku zdań podsumowania całości rozdziałów. Powyższe uwagi mają przede wszystkim charakter edytorski i nie umniejszają wysokiej wartości pracy.

Podsumowując, duże walory poznawcze i praktyczne pracy przeprowadzonej na szczegółowo zweryfikowanym i opisanym materiale, w oparciu o nowoczesną metodykę, ze sformulowaniem użytecznego algorytmu diagnostycznego, a także doskonała znajomość prezentowanych zagadnień przez lekarz Monikę Durzyńską, upoważniają mnie do stwierdzenia, że oceniana dysertacja w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom na stopień doktora.

W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie o dopuszczenie lekarz Moniki Durzyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, dnia 29 lipca 2019 r.

Prof. dr hab. n. med. Justyna Szumiło